

THE CORRELATION BETWEEN TERPENOID OF SARANG SEMUT (*Myrmecodia pendans*) WITH mRNA FRUCTOSYLTRANSFERASE EXPRESSION OF *Streptococcus mutans* BIOFILM ATCC 25175

Darul Rabil*, Eka Chemiawan**, Mieke H. Satari***, Meirina Gartika **

* Resident of Pediatric Dentistry Department, Faculty of Dentistry, Universitas Padjadjaran

** Lecturer of Pediatric Dentistry Department, Faculty of Dentistry, Universitas Padjadjaran

*** Lecturer of Oral Biology, Faculty of Dentistry, Universitas Padjadjaran

Correspondence : meirina.gartika@fkg.unpad.ac.id

Keywords:

Terpenoid dari Sarang semut, ekspresi mRNA *ftf*, Biofilm *Streptococcus mutans*

ABSTRACT

Background: Terpenoid isolate sarang semut (*Myrmecodia pendans*) is a natural material that has antibacterial power through the destruction of the cell membrane of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). Fructosyltransferase (*ftf*) is one of the extrapolymeric saccharides produced by *S. mutans*. The formation of Ftf is governed by the *ftf* gene. The aim of research was to know the correlation between terpenoid of Sarang semut administration with *ftf* mRNA expression of *S. mutans* biofilm ATCC 25175.

Method: The study used mixed methods, namely descriptive explorative method to look at the isolation of *ftf* gene and *ftf* mRNA expression. This study began with making 1 day biofilm, then given terpenoid isolates of sarang semut and chlorhexidine. Next, isolation of *ftf* genes and *ftf* mRNA expression was carried out, then the differences in *S. mutans* ATCC 25175 mRNA *ftf* expression in sarang semut and chlorhexidine were given for 1 and 30 minutes using Real-Time PCR. Continued by looking at the relationship of the duration of administration of sarang semut terpenoids to the expression of *S. mutans* ATCC 25175 mRNA *ftf* biofilm. Statistical analysis used the t test with p-value <0.05 and Pearson.

Results: The results showed that *ftf* gene with 130 bp length and *ftf* mRNA expression could be isolated from *S. mutans* biofilm ATCC 25175 which were given terpenoid isolates from sarang semut. The expression of sarang semut mRNA *ftf* and chlorhexidine did not have a significant difference for 1 minute ($p = 0.0761$), whereas in 30 minutes the ant nest had a higher mRNA expression ($p = 0.0186$). There is a relationship between the duration of administration of terpenoid isolates of sarang semut with *S. mutans* ATCC 25175 mRNA *ftf* expression ($r^2 = 0.614$), with a medium correlation coefficient.

Conclusion: The conclusion of the study were that sarang semut terpenoid had the same effect as chlorhexidine for 1 minute on *S. mutans* biofilms, whereas at 30 minutes it was different. There is a relationship between terpenoids of sarang semut isolates and *S. mutans* biofilm ATCC 25175 mRNA expression.

PENDAHULUAN

Salah satu bakteri dominan penyebab karies adalah *Streptococcus mutans* yang memiliki kemampuan membentuk biofilm gigi.¹ Survei epidemiologi menunjukkan bahwa jumlah *S. mutans* lebih besar pada anak-anak.²

Kondisi ini berhubungan dengan nilai dmft yang lebih tinggi.³

Salah satu virulensi bakteri penyebab karies gigi adalah kemampuannya untuk bertahan hidup dalam lingkungan rongga mulut

yang kompleks. *S. mutans* membentuk biofilm dengan organisme lain dalam rongga mulut.⁴ Penelitian menunjukkan bahwa bakteri yang tumbuh pada kondisi biofilm lebih tahan terhadap antibiotik daripada planktonik. Biofilm merupakan bentuk struktural sekumpulan mikroorganisme yang dilindungi oleh matriks ekstraseluler yang disebut ekstrapolisakarida (EPS).⁵

Polisakarida yang diproduksi oleh *S. mutans* adalah bagian utama matriks biofilm dan berfungsi dalam patogenitasnya.^{6,7} *S. mutans* berikatan dengan kuat pada permukaan berlapis glukosa dan tumbuh subur di lingkungan mulut yang kompleks dan berubah menjadi biofilm kariogenik. Glukosa merupakan salah satu polisakarida yang disintesis oleh *S. mutans* dengan bantuan glukosiltransferase (Gtf).^{8,9}

Selain menghasilkan Gtf, *S. Mutans* memproduksi fruktosiltransferase (Ftf), yang mengubah fruktosa menjadi fruktan. Fruktosiltransferase berfungsi sebagai sumber energi sehingga dapat digunakan selama metabolisme.¹⁰ Hal ini menyebabkan ftf memiliki peran dalam pembentukan biofilm.¹¹

Proses pembentukan awal biofilm memperlihatkan bahwa berbagai gen diperlukan *S. mutans* untuk beradaptasi. Setiap enzim diatur oleh gen nya seperti *glucosyltransferase* (*gtf*) dan *fructosyltransferase* (*ftf*). Sel yang ada dalam biofilm memiliki karakteristik fenotip berbeda yang disertai dengan perubahan signifikan dalam pola ekspresi gen. Ekspresi gen ini termasuk gen yang terkait dengan sistem komunikasi interseluler, sistem penginderaan lingkungan, regulator metabolisme karbohidrat, dan gen yang mempromosikan adhesi.¹² Ekspresi *gtf* pada

biofilm semakin lama akan meningkat sedangkan *ftf* sebaliknya.¹³

Saat ini banyak penelitian bahan alam yang dapat menghambat pertumbuhan salah satunya adalah sarang semut (*Myrmecodia pendans*).¹⁴ Sarang semut telah lama dikenal sebagai bahan pengobatan, diantaranya digunakan untuk berbagai jenis kanker dan tumor, seperti kanker otak, hidung, payudara, lever, paru-paru, usus, rahim, kulit, prostat, dan kanker darah.¹⁵ Tujuan penelitian ini untuk mengetahui apakah terdapat hubungan pemberian terpenoid isolat sarang semut terhadap ekspresi mRNA *ftf* dari biofilm *S. mutans* ATCC 25175.

METODE

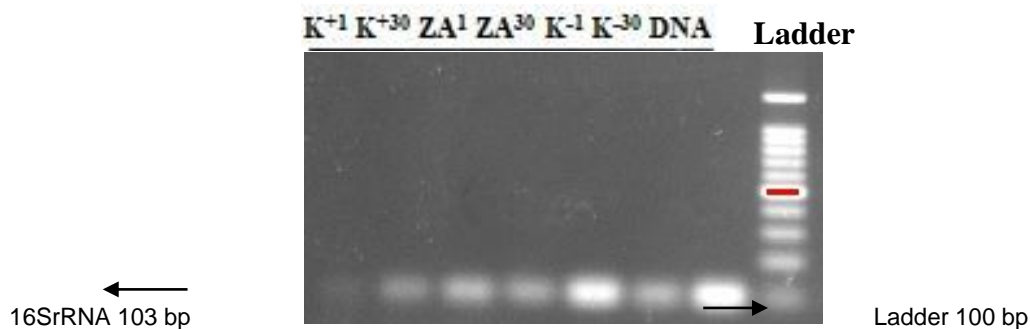
Penelitian ini dilakukan di Institut Teknologi Bandung dengan persetujuan etik no. 336/UN6.KEP/EC/2019 yang dikeluarkan oleh Komisi Etik Penelitian Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Universitas Padjadjaran. Pertama, dilakukan pembuatan biofilm *S. mutans* ATCC 25175 berumur 1 hari dan selanjutnya diberi terpenoid isolat sarang semut selama 1 dan 30 menit. Selanjutnya dilakukan isolasi gen *ftf* dan pemeriksaan ekspresi mRNA *ftf* dari biofilm *S. mutans* ATCC 25175 menggunakan *Real-Time* PCR. Penelitian ini menggunakan 16SrRNA sebagai *housekeeping gene*. Replikasi pada penelitian ini dilakukan sebanyak 5 kali. Analisis statistik menggunakan uji t berpasangan untuk melihat perbedaan ekspresi mRNA biofilm *S. mutans* ATCC 25175 antara pemberian terpenoid sarang semut selama 1 dan 30 menit dan uji Pearson dengan *p-value* < 0.05. Seluruh analisis dilakukan menggunakan program statistik *Excel Megastat*.

Tabel 1. Urutan primer dari *gen ftf* dan *16SrRNA*

Gen	Deskripsi
Ftf	Forward 5' AAATATGAAGGCGGCTACAACG 3'
	Reverse 5' CTCACCACTCTTAGCATCCTGAA 3'
16sRNA	Forward 5' CTTACCAGGTCTTGACATCCCG 3'
	Reverse 3' ACCCAACATCTCACGACACGAG 3'

HASIL

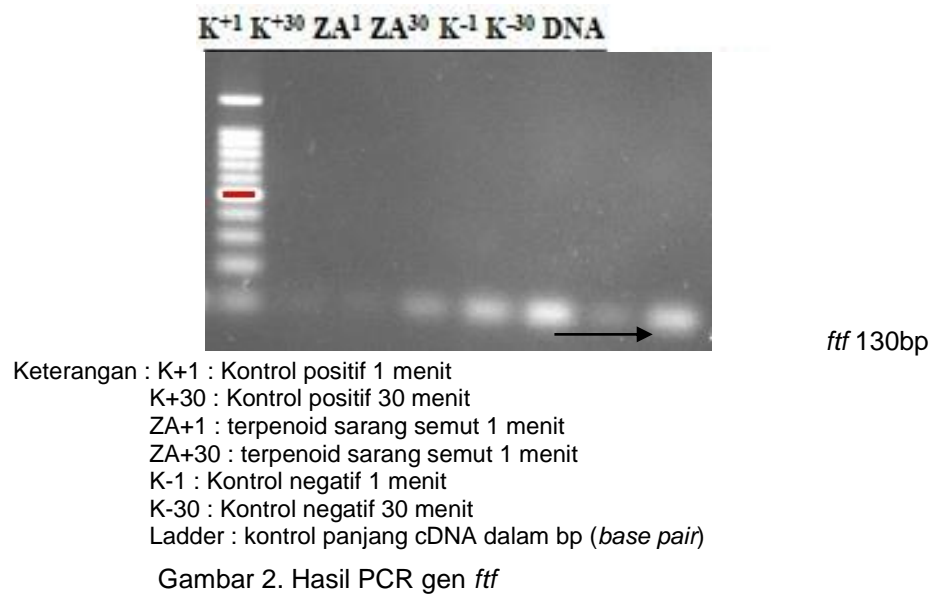
Pemeriksaan PCR (*non-purified*) dengan gen target 16SrRNA dan *ftf*. dilakukan menggunakan jasa Macrogen, Inc. Hasil PCR gen 16SrRNA ditunjukkan dalam Gambar 1.



Keterangan : K⁺1 : Kontrol positif 1 menit
 K⁺30 : Kontrol positif 30 menit
 Z⁺A⁺1 : terpenoid sarang semut 1 menit
 Z⁺A⁺30 : terpenoid sarang semut 1 menit
 K⁻1 : Kontrol negatif 1 menit
 K⁻30 : Kontrol negatif 30 menit
 Ladder : kontrol panjang cDNA dalam bp (*base pair*)

Gambar 1. Hasil PCR gen 16SrRNA

Gambar 1 menunjukkan hasil isolasi gen 16SrRNA yaitu adanya pita. dalam setiap bahan yang diperiksa. Gen 16SrRNA merupakan gen kontrol yang menunjukkan bahwa bahan yang diperiksa merupakan bakteri. Dari hasil pemeriksaan PCR gen 16SrRNA memiliki panjang 103 pasang basa.



Gambar 2 menunjukkan hasil isolasi gen *ftf*. Terlihat adanya pita pada tiap bahan yang diperiksa. Gen *ftf* yang terlihat memiliki panjang 130 pasang basa.

Tabel 2. Uji Perbedaan ekspresi mRNA *ftf* pada sarang semut dan klorheksidin pada 1 menit

Bahan uji	R	Mean	SD	Nilai P
Sarang semut	5	0,187102	0,108077	
Klorheksidin	5	0,082800	0,037960	0,0761 *)

Keterangan : R : replikasi
 SD : Standar Deviasi
 Nilai p : Nilai Kepercayaan (P<0,05)
 *) : Tidak bermakna/tidak signifikan

Tabel 2 menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi mRNA *ftf* antara pemberian sarang semut dan klorheksidin pada biofilm *S. mutans* ATCC 25175 dalam pemeriksaan 1 menit (nilai p = 0,0761). Hasil ini memiliki makna bahwa pemberian sarang semut dan klorheksidin selama 1 menit memiliki efek yang sama terhadap ekspresi mRNA *ftf*.

Tabel 3. Uji perbedaan ekspresi mRNA *ftf* pada sarang semut dan klorheksidin pada 30 menit

Bahan uji	R	Mean	SD	Nilai P
Sarang semut	5	1,238415	0,650277	
Klorheksidin	5	0,342674	0,565886	0,0185**)

Keterangan : R : replikasi
 SD : Standar Deviasi
 Nilai p : Nilai Kepercayaan (P<0,05)
 **) : Bermakna/signifikan

Tabel 3 menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ekspresi mRNA *ftf* pada biofilm *S. mutans* antara pemberian sarang semut dan klorheksidin selama 30 menit (nilai p = 0,0185). Hasil ini

memiliki makna bahwa sarang semut dan klorheksidin selama 30 menit memiliki efek yang berbeda terhadap ekspresi mRNA *ftf*.

Tabel 4. Uji korelasi terpenoid sarang semut dengan ekspresi mRNA *ftf*

Variabel	R	t-test	p-value	sifat	r ²
Waktu & <i>ftf</i>	,783	1,56	0,0073	Non-Sign	,614

Tabel 4 menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang positif lamanya pemberian terpenoid sarang semut (*Myrmecodia pendans*) terhadap peningkatan ekspresi mRNA *ftf* pada biofilm *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Hubungan yang signifikan tersebut ditunjukkan dengan nilai keterkaitan sebesar 0,614. Korelasi ini dapat diinterpretasikan dalam kriteria Guilford, hasil tersebut memiliki reliabilitas sedang.

DISKUSI

Penelitian ini menunjukkan gen *ftf* dan ekspresi mRNA *ftf* dapat diisolasi pada biofilm *S. mutans* yang diberi isolat terpenoid sarang semut (*Myrmecodia pendans*). Isolasi gen *ftf* yang terlihat merupakan hasil dari proses PCR yang memperlihatkan DNA yang akan diperiksa, sedangkan ekspresi mRNA *ftf* merupakan hasil proses *Real Time* PCR. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Li et al¹⁷ bahwa gen *ftf* dapat terisolasi dan terekspresi pada biofilm yang diberi kurkumin. Lamanya pemberian curcumin berpengaruh terhadap peningkatan ekspresi gen *ftf*.

Penelitian yang dilakukan Gartika et al¹⁸ menjelaskan bahwa pemberian terpenoid sarang semut selama 1 menit dapat menghancurkan 40% biofilm yang terbentuk. Burne et al¹⁹ menggunakan analisis *chloramphenicol acetyltransferase* (CAT), terlihat ekspresi *ftf* pada biofilm berumur 2 hari, kemudian diberikan 0.025 mol/L sukrosa sehingga menunjukkan peningkatan ekspresi dari menit 0 ke 10. Hasil yang sama terlihat pada pemeriksaan biofilm yang berumur 7 hari.

Fruktan dapat memengaruhi patogenesis karies gigi dengan fungsinya sebagai penyimpanan karbohidrat ekstraseluler dan dapat dimetabolisme oleh bakteri selama periode kekurangan nutrisi. Fruktosa yang dilepaskan dari hidrolisis fruktan dapat memasuki siklus glikolitik dan dimetabolisme menjadi asam laktat, yang dapat menyebabkan demineralisasi permukaan email gigi dan berkontribusi terhadap pembentukan karies gigi.²⁰ Siklus glikolitik merupakan proses metabolisme glukosa menjadi asam laktat. Saat ini, terbukti bahwa fruktan membantu proses adhesi bakteri oral tertentu ke permukaan gigi. Ftf bebas juga ditemukan menyerap ke dalam lapisan glukosa *S. mutans* dan membantu sintesis glukosa oleh Gtf bebas.²¹ Ftf dan produknya (fruktan) berperan dalam pembentukan biofilm gigi dan berhubungan dengan proses karies gigi.²²

Penelitian Rozen et al²¹ menunjukkan jumlah rendah ftf bebas di luar sel ketika *S. mutans* dibiakkan dengan penambahan sukrosa. Tingkat ftf yang rendah ini, ditemukan sebagai hasil dari adsorpsi ftf bebas di luar sel

ke *S. mutans* yang dilapisi glukosa, yang terbentuk selama pertumbuhan dengan adanya sukrosa. Berbeda dengan temuan lain, Milward dan Jacques²³ menunjukkan pelepasan cepat *fff* pada permukaan sel *Streptococcus salivarius* setelah penambahan sukrosa.²¹

Sekresi *fff* yang mengekspresikan pengikatan glukosa oleh *S. mutans* dapat memberikan keuntungan dalam biofilm gigi. Temuan Rozen et al²⁰ menunjukkan bahwa fruktan dapat mempromosikan proses adhesi bakteri spesifik ke permukaan yang keras.²⁰ Adhesi fruktan dapat dimediasi melalui pengikat fruktan atau pada enzim Ftf. Identifikasi mengenai pengikat fruktan tersebut masih harus dieksplorasi. Pengikatan *fff* dengan glukosa juga dapat meningkatkan retensi *S. mutans* ke permukaan yang dilapisi glukosa dengan menjembatani antara glukosa.²¹

Sukrosa juga dapat membantu peningkatan sintesis fruktan pada permukaan *S. mutans*. Kemampuan *S. mutans* untuk menghasilkan fruktan dalam jumlah tinggi menyebabkan adanya senyawa karbohidrat jangka pendek yang dapat meningkatkan kelangsungan hidup bakteri selama periode kekurangan nutrisi dalam biofilm. Fruktosa yang dilepaskan dari hidrolisis fruktan dapat dimanfaatkan oleh bakteri dan menghasilkan asam laktat, sehingga berkontribusi terhadap perkembangan karies gigi. Selain itu, jumlah tinggi fruktan yang diproduksi *S. mutans* juga dapat meningkatkan virulensi bakteri dengan berperan sebagai bahan kapsul yang dapat melindunginya dari sistem kekebalan tubuh.²⁴

Tingkat ekspresi *fff* dalam biofilm dengan pH rendah tidak meningkat seperti dalam biofilm yang terbentuk dengan media yang ditambahkan zat tertentu. Populasi *S. mutans* tergantung dengan adanya sukrosa

sebagai penginduksi efisien dari ekspresi gen *fff*. Namun, penambahan glukosa ke biofilm hanya memiliki efek sedikit pada gen *fff*. Dalam kultur kimia yang stabil, dengan menurunkan pH dari 7 menjadi 6, dapat meningkatkan transkripsi *fff*, sehingga faktor ini cenderung memiliki efek pada *fff* setelah penambahan karbohidrat. Dengan demikian, faktor global yang mengatur ekspresi gen dalam kaitannya dengan aliran karbohidrat atau pH dapat tumpang tindih dengan regulator yang mengontrol transkripsi *fff*.^{13,11}

Penelitian Abranches et al²⁵ menemukan bahwa *Catabolite Control Protein A* (CcpA) berperan dalam penentuan virulensi. Hal ini menunjukkan bahwa gen *gtfB* dan *fff* memerlukan CcpA untuk ekspresi optimal. Berdasarkan studi genetika, percobaan biokimia dan fisiologis menunjukkan bahwa hilangnya CcpA berdampak pada kemampuan *S. mutans* untuk transportasi dan pertumbuhan.²⁵

Diketahui ekstrak kasar sarang semut tergolong *concentration-dependent* atau dapat juga disebut memiliki antibakteri yang fungsinya tergantung dari konsentrasi bahan. Antibakteri golongan ini memiliki perbedaan antara efek maksimum dan minimum yang relatif besar dan dengan peningkatan konsentrasi akan meningkatkan kemampuan bunuh terhadap bakteri.²⁶ Efek antibakteri yang optimal dari *concentration-dependent* bergantung pada luas area di bawah kurva penghambatan yang disederhanakan menjadi rasio antara konsentrasi optimal.²⁷

Ekstrak, fraksi, maupun isolat umbi sarang semut telah terbukti selain mempunyai aktivitas antibakteri juga memiliki aktivitas antioksidan, imun modulator, dan antikanker. Penelitian sebelumnya ditemukan bahwa ekstrak etil asetat dari *M. pendans* dapat

menghambat pertumbuhan *S. mutans*. Senyawa terpenoid termasuk diterpenoid, monoterpenoid, dan sesquiterpenoid dilaporkan memiliki banyak aktivitas antibakteri dan antimikroba.²⁸

Terpenoid dari sarang semut adalah hasil maserasi sarang semut dari bagian umbi dan memiliki daya antibakteri. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa terpenoid sarang semut memiliki nilai MBIC (*Minimum Biofilm Inhibitory Concentration*) terpenoid dari sarang semut terhadap biofilm *S. mutans* adalah 50 ppm, dan nilai MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) adalah 40 ppm.¹⁸ Penelitian Attamimi et al¹⁵ menunjukkan bahwa ekstrak kasar umbi sarang semut memiliki nilai MIC antara 9,77 ppm dan 19,53 ppm.¹⁵

Penelitian ini menunjukkan adanya hubungan yang positif lamanya pemberian terpenoid isolate sarang semut dengan gen *fff* pada biofilm *S. mutans* ATCC 25175. Disamping itu penelitian ini dilakukan pada kondisi biofilm yang menyulitkan senyawa aktif untuk menembus EPS dari biofilm.

KESIMPULAN

Terpenoid sarang semut memiliki efek yang sama dengan klorheksidin selama 1 menit pada biofilm *S. mutans*, sedangkan pada 30 menit berbeda. Terdapat hubungan terpenoid isolat sarang semut dengan ekspresi mRNA *fff* biofilm *S. mutans* ATCC 25175.

DAFTAR PUSAKA

1. Alazmah A. Early Childhood Caries: A Review. *Early Child Caries A Rev J Contemp Dent Pract J Contemp Dent Pr.* 2017;1818(88):1–61.
2. Widayati N. Faktor yang berhubungan dengan karies gigi pada anak. *J Berk Epidemiol.* 2014;2(2):196–205.
3. Khotimah K, Suhadi Ns P. Faktor-faktor yang berhubungan dengan kejadian karies gigi pada anak usia 6-12 tahun di SD Negeri Karangayu 03 Semarang. *STIKES Telogorejo Semarang.* 2013;014:1–10.
4. Negrini TDC, Spolidorio LC. Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* in Brazilian family members. *Brazilian J Microbiol.* 2003;34:213–7.
5. Warna D, Fatmawati A, Gigi BK, Gigi FK, Jember U. Hubungan biofilm *Streptococcus mutans* terhadap resiko terjadinya karies gigi. *J Kedokt Gigi Univ Jember.* 2011;8(3):127–30.
6. Jiang S, Huang X, Zhang C, Cai Z. Morphological and proteomic analyses of the biofilms generated by *Streptococcus mutans* isolated from caries-active and caries-free adults. *J Dent Sci.* 2015;10(2):206–15.
7. Krzysciak W, Jurczak A, Koscielniak D, Bystrowska B. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33:499–515.
8. Jeon J, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: current (Limited) knowledge. *Caries Res.* 2011;45:243–63.
9. Seneviratne CJ, Zhang CF, Smaranayake LP. Dental plaque biofilm in oral health and disease. *Chinese J Dent Res.* 2011;14(2):87–94.
10. Lei L, Yang Y, Mao M, Li H, Li M, Yang Y, et al. Modulation of biofilm exopolysaccharides by the *Streptococcus mutans* *vicX* Gene. *Front Microbiology.* December 2015;6:1–14.
11. Sato S, Kuramitsu HK. Isolation and characterization of a fructosyltransferase gene from *Streptococcus mutans* GS-5. *Infect Immun.* 1986;52(1):166–70.
12. Shemesh M, Tam A, Steinberg D. Expression of biofilm-associated genes of *Streptococcus mutans* in response to glucose and sucrose. *J Med Microbiol.* 2007;56:1528–35.
13. Li Y, Burne RA. Regulation of the *gtfBC* and *fff* genes of *Streptococcus mutans* in biofilms in response to pH and carbohydrate. *Soc Gen Microbiol J.* 2001;147:2841–8.
14. Gartika M, Mariam MS, Kurnia D, Satari MH. Antibacterial of terpenoid A from Sarang Semut (*Myrmecodia pendans*) against *Streptococcus mutans*. *Int J Chemtech Res.* 2018;11(01):228–33.
15. Attamimi FA, Ruslami R, Maskoen AM.

- Uji aktivitas antibakteri ekstrak kasar umbi sarang semut (*Myrmecodia pendens*) *Streptococcus sanguinis* dibandingkan Chlorhexidine. *Maj Kedokt Bandung*. 2017;49(2):94–101.
16. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(4):564–82.
 17. Li B, Li X, Lin H, Zhou Y. Curcumin as a promising antibacterial agent: effects on metabolism and biofilm formation in *S. mutans*. *Biomed Res Int*. 2018;1–11.
 18. Gartika M, Pramesti HT, Kurnia D, Satari MH. A terpenoid isolated from sarang semut (*Myrmecodia pendens*) bulb and its potential for the inhibition and eradication of *Streptococcus mutans* biofilm. *BMC Complement Altern Med*. 2018;18(151):1–8.
 19. Burne RA, Chen YM, Penders JEC. Analysis of gene expression in *Streptococcus mutans* in biofilms in vitro. *Adv Dent Res*. 1997;11(1):100–9.
 20. Rozen R, Bachrach G, Bronshteyn M, Gedalia I, Steinberg D. The role of fructans on dental biofilm formation by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*. *FEMS Microbiol Lett*. 2001;195:205–10.
 21. Rozen R, Steinberg D, Bachrach G. *Streptococcus mutans* fructosyltransferase interactions with glucans. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;232(1):39–43.
 22. Lee SF, Delaney GD, Elkhateeb M. A Two-component covRS regulatory System regulates expression of fructosyltransferase and a novel extracellular carbohydrate in *Streptococcus mutans* A two-component covRS regulatory system regulates expression of fructosyltransferase and a novel extracellular. *Am Soc Microbiol*. 2004;72(August 2004):3968–73.
 23. Milward P, Jacques A. Secretion of fructosyltransferase by *Streptococcus salivarius* involves the sucrose-dependent release of the cell-bound form. *J Gen Microbiol*. 1990;136(May):165–9.
 24. Pabst J, Cisar OTL. The cell wall-associated levansucrase of *actinomyces viscosus*. *Biochim Biophys Acta*. 1979;566:274–82.
 25. Abranches J, Nascimento MM, Zeng L, Browngardt CM, Wen ZT, Rivera MF, et al. CcpA regulates central metabolism and virulence gene expression in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. 2008;190(7):2340–9.
 26. Abdul-aziz MH, Roberts JA, Lipman J, Mouton JW, Hope WW. Applying pharmacokinetic/Pharmacodynamic principles in critically ill patients: optimizing efficacy and reducing resistance development. *Thieme Med Publ*. 2015;36:136–53.
 27. Richards GA, Bch MB, Sa FCP, Joubert IA, Bch MB, Sa DA, et al. Optimising the administration of antibiotics in critically ill patients. *South African Med J*. 2015;105(5):1–5.
 28. Ariningtyas E, Hemiawati SM, Laksono B. Perbedaan potensi antibakteri ekstrak metanol umbi sarang semut (*Myrmecodia pendens* Merr & Perry) dan NaOCl terhadap *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). *J Kedokt Gigi*. 2016;28(2):1–7.